



TITLE:

# 細胞外マトリックスの硬さによる 細胞遊走制御の分子メカニズムの 解明( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

市川, 彩花

---

CITATION:

市川, 彩花. 細胞外マトリックスの硬さによる細胞遊走制御の分子メカニズムの解明. 京都大学, 2017, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2017-07-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20634>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開

( 続紙 1 )

京都大学	博士（農学）	氏名	市川 彩花
論文題目	細胞外マトリックスの硬さによる細胞遊走制御の分子メカニズムの解明		
(論文内容の要旨)			
<p>動物細胞を取り囲むコラーゲンなどの細胞外マトリックス(ECM)は、細胞外微小環境を構成しており、その種類だけでなく「硬さ」も増殖や分化などの細胞の挙動を制御している。またECMが硬いとがん細胞の遊走能が上昇し、悪性化することも知られている。そのため、細胞がECMの硬さを感知して細胞遊走を制御する分子メカニズムの解明は、がん等の疾患の治療や予防のための重要な知見となる。細胞は、ECMと細胞との接着装置である「接着斑」を介してECMの硬さを感知しており、これまでに、接着斑タンパク質ビンキュリン-ビネキシンα複合体がECMの硬さセンサーとして機能し、硬いECM上での細胞遊走を促進することが明らかにされている。しかし、ビンキュリン-ビネキシンα複合体の下流で細胞遊走を調節するメカニズムについては不明である。本研究では、細胞遊走のシグナル伝達に関与する細胞膜ドメイン「脂質ラフト」に着目し、ビンキュリン-ビネキシンα複合体が硬いECM上での速い細胞遊走を引き起こす機構を明らかにした。本論文の主な内容は以下のとおりである。</p> <p>第1章では、ビンキュリン-ビネキシンα複合体が脂質ラフトに局在し、そのことが硬いECM上での速い細胞遊走を可能にするという仮説をたて、これを検証した。まず、蛍光染色法を用いて接着斑と脂質ラフトの共局在について検討した。脂質ラフトに多く含まれる脂質であるガングリオシドGM1に対する蛍光プローブで細胞を染色したところ、GM1が接着斑に濃縮されていることを見出し、接着斑が脂質ラフト様の細胞膜を持つことを示した。次に生化学的な分画実験により脂質ラフトが濃縮された画分を得て、ビンキュリンとビネキシンαの脂質ラフトへの局在を検討した。脂質ラフト濃縮画分としては、細胞から単離した膜画分を4℃で界面活性剤トリトンX-100で処理し、その不溶性(detergent resistant membrane: DRM)画分をそのまま、あるいはDRM画分を密度勾配超遠心した後の低密度画分を用いた。その結果、ビンキュリンとビネキシンαは脂質ラフト濃縮画分に分配されたことから、両者は脂質ラフトに局在することが示唆された。また、ビンキュリンが脂質ラフト濃縮画分に分配されるためには、ビネキシンαとの相互作用、および脂質ラフトに濃縮することが知られている脂質PIP<sub>2</sub>との相互作用が必要であった。一方で、ビネキシンαの脂質ラフト濃縮画分への分配にはビンキュリンとの相互作用は不要であった。続いて、細胞内張力やECMの硬さがビンキュリンの脂質ラフトへの局在に与える影響について検討した。硬いECM上では軟らかいECM上に比べ強い細胞内張力が発生し、それがECMの硬さの感知に重要であると考えられている。そこで硬い基板上で細胞を培養し、細胞内張力の発生</p>			

に参与するミオシンIIを阻害したところ、ビンキュリンの脂質ラフト濃縮画分への分配量が減少した。また、硬さの異なるアクリルアミドゲル培養基板上で細胞を培養した後、それぞれから脂質ラフト濃縮画分を得て解析した。その結果、軟らかいECM上に比べ硬いECM上ではビンキュリンの脂質ラフト濃縮画分への分配が増加していた。このことから、硬いECMと強い細胞内張力によってビンキュリンの脂質ラフトへの局在が促進されることが示された。これまでに、軟らかいECM上に比べ硬いECM上では、ビネキシン $\alpha$ によって接着斑にビンキュリン分子が安定的にとどまる（本論文ではこのことを不動性と呼ぶ）ことがわかっており、このビンキュリンの不動性の亢進がECMの硬さの感知にかかわっていると考えられている。そこで、ビンキュリンの不動性変化への脂質ラフトの関与について調べるため、メチル- $\beta$ -シクロデキストリン (M $\beta$ CD)処理により脂質ラフトを破壊し、ビンキュリンの光褪色後蛍光回復解析を行った。その結果、接着斑上でのビンキュリンの不動性がビネキシン $\alpha$ とECMの硬さ依存的に上昇するには、脂質ラフトが必要であることが明らかとなった。最後に、改変スクラッチアッセイによる細胞遊走能を評価した。その結果、M $\beta$ CD処理により脂質ラフトを破壊すると、硬いECM上での速い細胞遊走能は消失した。また、一細胞レベルでの遊走能解析から、硬いECM上での細胞遊走の「速さ」と「直進性」がM $\beta$ CD処理により低下した。このことから、硬いECM上での細胞遊走には脂質ラフトが必要であることが明らかになった。以上の結果から、ECMの硬さによる細胞遊走能の制御には、ビンキュリンの脂質ラフト局在化が関与していることが示唆された。

第2章では、ECMの硬さに応答した細胞遊走制御への上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR)の関与について検証した。EGFRは細胞増殖だけでなく、細胞遊走の調節にも関わる受容体型チロシンキナーゼである。また脂質ラフトでEGFRが活性化されると、下流に強いシグナルが惹起される。そのため、まずビンキュリンとビネキシン $\alpha$ の発現が脂質ラフトにおける活性型EGFR量に与える効果について調べた。その結果、ビンキュリンまたはビネキシン $\alpha$ の発現によって脂質ラフトにおける活性型EGFR量が増加した。次にECMの硬さに応答した細胞遊走制御にEGFRが必要であることを調べるため、EGFR阻害剤であるAG1478を処理し、硬さの異なる培養基板上で改変スクラッチアッセイを行った。その結果、コントロール条件で見られていた硬いECM上での速い細胞遊走はAG1478処理によって消失した。一方、軟らかいECM上ではAG1478処理は細胞遊走能に影響しなかった。これらの結果から、硬いECM上においてビンキュリン - ビネキシン $\alpha$ 複合体が脂質ラフト上での活性型EGFR量を増加させることで、細胞遊走を促進させることが示唆された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

動物細胞を囲む細胞外マトリックス(ECM)の硬さは、細胞の遊走や分化を調節している。また、がんの悪性化とECMの硬さとの関連が示唆されている。そのため、細胞がECMの硬さを感知して細胞機能を調節するメカニズムの解明が望まれている。これまでにECMと細胞との接装置である接着斑に局在するタンパク質ビンキュリンとビネキシン $\alpha$ がECMの硬さの感知に必要なことは示されていたが、それらの分子が細胞遊走を調節する分子メカニズムについては不明であった。本論文は、細胞遊走のシグナル伝達に關与する細胞膜ドメイン「脂質ラフト」とビンキュリン、ビネキシン $\alpha$ との關係に着目し、ECMの硬さに応答した細胞遊走の分子メカニズムを明らかにしたものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. ビンキュリンとビネキシン $\alpha$ が脂質ラフトに局在していることを明らかにした。  
また、ビンキュリンの脂質ラフト局在にはビネキシン $\alpha$ およびPIP<sub>2</sub>との結合が必要であることを明らかにした。
2. ECMの硬さと細胞内張力がビンキュリンの脂質ラフトへの局在を調節していることを明らかにした。また、脂質ラフトが硬いECM上での速い細胞遊走に必要なことを示した。
3. 硬いECM上において、ビンキュリンとビネキシン $\alpha$ が脂質ラフトにおける活性型EGFR量を増加させることを明らかにした。また、硬いECM上での速い細胞遊走能にEGFRの活性化が必要であることを明らかにした。

以上のとおり、本論文はECMの硬さに応答した細胞遊走の分子メカニズムを明らかにしたものであり、分子細胞生物学、細胞生化学および基礎生理学の発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成29年5月11日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の關係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：        年        月        日以降（学位授与日から3ヶ月以内）